(19) BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

PATENTSCHRIFT

(11) DD 296 075

Δ5



(12) Ausschließungspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1
Patentgesetz der DDR
vom 27.10.1983
in Übereinstimmung mit den entsprechenden
Festlegungen im Einigungsvertrag

5(51) C 07 D 295/04 C 07 D 277/04 C 07 D 403/02 C 07 D 409/02 C 12 N 9/99

DEUTSCHES PATENTAMT

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	DD C 07 D / 331 544 5	(22)	07.08.89	(44)	21.11.91			
(71)	siehe (73)							
(72)	Neubert, Klaus, Doz. Dr. sc. nat. DiplChem.; Born, Ilona, Dr. rer. nat. DiplChem.; Faust, Jürgen, Dr. rer. nat. DiplChem.; Heins, Jochen, Dr. rer. nat. DiplBiol.; Barth, Alfred, Prof. Dr. sc. nat. DiplChem.; Demuth, Hans-Ulrich, Dr. sc. nat. DiplBiochem.; Rahfeld, Jens U., DiplBiochem.; Steinmetzer, Torsten, DiplBiochem., DE							
(73)	Martin-Luther-Unviersität Halle – Wittenberg, Universitätsplatz 10, O - 4010 Halle, DE							
(74)	siehe (73)				•	٠.		
(54)	Verfahren zur Herstellung r	euer Inhibitor	en der Dipeptidyl	Peptidase IV				

(55) Inhibitoren; Dipeptidyl Peptidase IV; Aminosäurederivate; heterocyclische Amidstruktur; Herstellung; kompetitive Hemmung; Therapeutika; Medizin; Immunbiochemie; pharmazeutische Industrie (57) Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zur Herstellung neuer Inhibitoren der Dipeptidyl Peptidase IV auf der Basis spezieller Aminosäurederivate mit heterocyclischer Amidstruktur, die die katalytische Aktivität des Enzyms in gereinigter Form als auch in normalen oder pathologisch veränderten menschlichen und tierischen Seren, in Organen, Geweben und Zellen menschlicher, tierischer, pflanzlicher und mikrobieller Herkunft sowohl in vivo als auch in vitro kompetitiv hemmen und als potentielle Therapeutika in Bereichen der durch die Dipeptidyl Peptidase IV regulativ gesteuerten Stoffwechselprozesse zur Anwendung kommen. Die Erfindung ist zur Anwendung in der Medizin, insbesondere in der Immunbiologie und Pathologie und für die pharmazeutische Industrie von Bedeutung.

ISSN 0433-6461

358

7 Seiten

Patentanspruch:

1. Verfahren zur Herstellung neuer Inhibitoren der Dipeptidyl Peptidase IV, gekennzeichnet dadurch, daß Aminosäureamide der allgemeinen Formel I

A–B

synthetisiert werden, worin A und B wie folgt definiert sind:

A = α-Aminocarbonsäure der Struktur H₂N-CHR-COOH (R = aliphatischer, aromatischer oder heterocyclischer Rest, beispielsweise Alanin, Valin, Leucin, Serin, Threonin, Cystein, Methionin, Prolin, Lysin, Arginin, Histidin, Glutaminsäure, Glutamin, Asparaginsäure, Asparagin, Phenylaianin, Tyrosin, Tryptophan, Norvalin, Norleucin, Ornithin, 2,4-Diaminobuttersäure, α-Aminobuttersäure, vorzugsweise Isoleucin- jewells in der L-Konfiguration, α-Aminoisobuttersäure, im Falle der trifunktionellen Aminosäuren auch die entsprechenden N^ω- oder C^ω- oder O- bzw. S-substituierten Derivate in der L-Konfiguration, vorzugsweise N^ω-Acyl, C^ω- bzw. O-Benzyl-Aminosäuren, beispielsweise N^ε-4-Nitrobenzyloxycarbonyl-L-Lysin, O-Benzyl-L-Serin, O-Benzyl-L-Tyrosin, L-Glutaminsäure-γ-benzylester, L-Asparaginsäure-β-benzylester sowie entsprechende, insbesondere durch Halogen, Nitro-, Hydroxy-, niedere lineare oder verzweigte Alkyl- bzw. Alkoxy-Reste ringsubstituierte Derivate des L-Phenylalanins, L-Tyrosins, L-Tryptophans, vorzugsweise 4-Nitro-L-Phenylalanin bzw. α-Iminocarbonsäuren

CH-COOH mit n = 2,3,4 beispielsweise L-Azetidin-2-carbonsäure, der Struktur HN L-Prolin, L-Pipecolinsäure, verwandte Verbindungen wie L-3,4-Dehydroprolin, L-Thioprolin sowie die entsprechenden durch Halogen-, Nitro-, Hydroxy-, Cyano-, niedere lineare oder verzweigte Alkyl- bzw. Alkoxyreste substituierten Derivate, beispielsweise L-4-Hydroxyprolin. B = spezielle heterocyclische Amine oder heterocyclische Aminaldehyde: Pyrrolin, Thiazolin, Piperidin, Morpholin, Pyrazolin, Pyrazolidin, Piperazin, Oxazolin, Oxazolidin, Imidazolin, Imidazolldin, Azetidin, Aziridin vorzugsweise Pyrrolidin, Thiazolidin, L-Prolinal, L-Thioprolinal, sowie die entsprechenden durch Halogen-, Nitro- bzw. Alkylreste substitulerten Derivate und ihre Darstellung ausgehend von X-A-Y bzw. X-A(Z)-Y (im Falle einer trifunktionellen Aminosäure für A) durch Umsetzung mit B, worin A und B wie oben definiert sind, X für eine in der Peptidchemie aebräuchliche a-Aminoschutzgruppe, vorzugsweise der tert. Butyloxycarbonyl-Rest steht, Z in Abhängigkeit von der Struktur der trifunktionellen Aminosäure eine gebräuchliche Seltenkettenschutzgruppe, bevorzugt vom tert. Butyl-Typ (tert. Butyloxycarbonyl, tert. Butylester, O- oder S-tert. Butyl) darstellt, und Y Hydroxy, Aktivester, bevorzugt Pentafluorphenyl bzw. N-Hydroxysuccinimidester bedeutet nach den in der Peptidchemie üblichen Methoden zur Knüpfung der Amidbindung, vorzugsweise über die Mischanhydridtechnik bzw. die 😅 Aktivestermethode erfolgt und anschließend die für X und Zeingesetzten Schutzgruppen mit den in der Peptidchernie üblichen Deblockierungsverfahren für die oben genannten Schutzgruppen vom tert. Butyl-Typ durch Acidolyse entfernt und falls erforderlich durch Umkristallisation bzw. durch. Säulenchromatographie an Sephadex G 10 oder schwach saurem lonenaustauscher gereinigt werden.

2. Verfahren zur Herstellung neuer Inhibitoren der Dipeptidyl Peptidase IV nach Anspruch 1, gekennzeichnet dadurch, daß die Aminosäurederivate

lle-pyrrolidid,

lle-thiazolidid,

lle-prolinal,

lle-thioprolinal,

Nº-4-Nitrobenzyloxycarbonyl-Lys-pyrrolidid,

Nº-4-Nitrobenzyloxycarbonyl-Lys-thiazolidid,

Nº-4-Nitrobenzyloxycarbonyl-Lys-prolinal

N°-4-Nitrobenzyloxycarbonyl-Lys-thioprolinal.

hinsichtlich ihrer Inhibitorischen Wirkpotenz bevorzugte Verbindungen darstellen.

3. Verfahren zur Herstellung neuer Inhibitoren der Dipeptidyl Peptidase IV nach Anspruch 1 und 2, gekennzeichnet dadurch, daß diese und/oder deren pharmazeutisch annehmbare Salze die ketalytische Aktivität des Enzyms in gereinigter Form als auch in normalen oder pathologisch veränderten menschlichen und tierischen Organen, Geweben und Zellen menschlicher, tierischer, pflanzlicher und mikrobieller Herkunft sowohl in vivo als auch in vitro hemmen und als potentielle Therapeutika in Bereichen der durch die Dipeptidyl Peptidase IV regulativ gesteuerten Stoffwechselprozesse für die Medizin von Bedeutung sind.

Anwendungsgebiet der Erlindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung neuer Inhibitoren der Dipeptidyl Peptidase IV (DPIV) auf der Basis spezieller Aminosäurederivate mit heterocyclischer Amidstruktur. Die erfindungsgemäßen Verbindungen hemmen die katalytische Aktivität der Dipeptidyl Peptidase IV kompetitiv und können als reversible DD IV-Inhibitoren im Bereich medizinisch-biologischer Prozesse, an denen das Enzym funktionell beteiligt ist, als potentielle Diagnostika bzw. Therapeutika zur Anwendung kommen. Die Erfindung ist zur Anwendung in der Human- und Veterinärmedizin, Pathobiochemie, Pharmakologie, Immunbiochemie und für die pharmazeutische Industrie geeignet.

Charakteristika des bekannten Standes der Technik

Die Dipeptidyl Peptidase IV ist ein im Säugerorganismus ubiquitär vorkommendes Enzym. Sie ist eine Serinprotease mit ausgeprägter Substratspezifität, die konsekutiv vom N-terminalen Ende einer Peptid- oder Proteinkette Dipeptide der Struktur X₄-Pro und X₄-Ala abspaltet, vorausgesetzt in dritter Position der Sequenz befinden sich keine Prolin- oder Hydroxyprolin-Reste (vgl. Küllertz et al., Dipeptidyl Peptidase IV - Chemie, Blochemie und physiologische Aspekte, Belträge zur Wirkstofforschung Heft 11, Akademie-Industrie-Komplex Arzneimittelforschung 1981). Neuere Befunde zeigen, daß die Dipeptidyl Peptidase IV ein physiologisch-blochemisch relevantes Enzym zu sein scheint, das en einer Reihe von Stoffwechselprozessen, u.a. der Blutdruckregulation, Blutgerinnung und Proliferationsprozessen funktionell beteiligt ist (vgl. G. Küllertz et al., Dipeptidyl Peptidase IV-Biochemie, Physiologie und Pathobiochemie, Beiträge zur Wirkstofforschung, Heft 27, Akademie-Industrie-Komplex Arzneimittelforschung 1988). Bekanntist, daß X_{ss}-Pro- bzw. X_{ss}-Ais-Dipeptide als kompetitive inhibitoren der Dipeptidyl Peptidese IV wirksam sind, wobei ihre inhibitorische Wirkpotenz von der Struktur des N-terminalen Aminosäure X, abhängig ist. Insgesamt gesehen ist aber ihre inhibitorische Wirksamkelt nicht stark ausgeprägt (H.U. Demuth, Dissertation A, Math.-Nat. Fakultät der Universität Halle 1981). Darüber hinaus wurden kürzlich irreversible Inhibitoren (Acylenzyminhibitoren) für die Dipeptidyl Peptidese IV vom Dipeptidyl-O-Aroyi-hydroxylamin-Typ beschrieben (vgl. H.U. Demuth et al., J. Enzyme Inhibition [1988], 2, 129). Bei solchen inhibitoren sind toxikologische Bedenken bei in-vivo-Untersuchungen nicht auszuschließen. Außerdem ist im Falle eines therapeutischen Einsatzes von DP IV-Inhibitoren der reversiblen Hemmung von Enzymaktivitäten der Vorzug zu geben.

Ziel der Erfindung

Das Ziel der Erfindung besteht darin, einfach herstellipare, hochwirksame reversible inhibitoren für die Dipeptidyl Peptidase IV auf der Basis spezieller Aminosäurederivata mit heterocyclischer Amidstruktur zur Verfügung zu stellen, di∉als gut verträgliche Substanzen sowohl in vitro als auch in vivo die katalytische Aktivität der DP IV kompetitiv hemmen, wobel zweckgebunden in Abhängigkeit von der Molekülstruktur eine graduelle Abstufung ihrer inhibitorischen Potenz erreicht werden kann und die bevorzugt in der Medizin, sowohl im Bereich der Diagnostik als auch in der Therapie von Bedeutung sein könnten.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, neue Inhibitoren für die Dipeptidyl Peptidase IV vom Aminosäureamid-Typ zu entwickeln, die reversibel die katalytische Aktivität der DP IV hemmen und sich durch folgende Vorteile auszeichnen:

- 1. Einfache Molekülstruktur
- 2. Einfache und damit kostengünstige Herstellung
- 3. Gezielte Modullerung der inhibitorischen Wirkpotenz durch Strukturmodifikation
- 4. Günstige physikalisch-chemische Parameter im Sinne einer hohen Penetriarfähigkeit
- 5. Hohe Bioverfügbarkelt am Wirkort

Die Aufgabe wird dadurch gelöst, daß Aminosäureamide der allgemeinen Formel I

A-E

(1)

synthetisiert werden, worin A und B wie folgt definiert sind:

A = G-Aminocarbonsäure der Struktur H₂N-CHR-COOH (R-aliphatischer, erometischer oder heterocyclischer Rest):

beispielsweise Alanin, Valin, Leucin, Serin, Threonin, Cystein, Methionin, Prolin, Lysin, Arginin, Histidin, Glutaminsäure,
Glutamin, Asparaginsäure, Asparagin, Phenylalanin, Tyrosin, Tryptophan, Norvalin, Norleucin, Ornithin,
2,4-Diaminobuttersäure, G-Aminobuttersäure, vorzugsweise Isoleucin- Jewells in der L-Konfiguration, G-Aminoisobuttersäure, im

Falle der trifunktionellen Aminosäuren auch die entsprechenden N°- oder C°- oder O- bzw. S-substitulerten Derivate in der L-Konfiguration, vorzugsweise N°-Acyl-, C°- bzw. O-Benzyl-Aminosäuren, beispielsweise N°-4-Nitrobenzyloxycarbonyl-L-Lysin, O-Benzyl-L-Serin, O-Benzyl-L-Tyrosin, L-Glutaminsäure-γ-benzylester, L-Asparaginsäure-β-benzylester sowie entsprechende, insbesondere durch Halogen-, Nitro-, Hydroxy-, niedere lineare oder verzweigte Alkyl- bzw. Alkoxy-Reste ringsubstituierte Derivate des L-Phenylalanins, L-Tyrosins, L-Tryptophans, vorzugsweise 4-Nitro-L-Phenylalanin, bzw. α-iminocarbonsäuren der Struktur

mit n = 2,3,4, beispielsweise L-Azetidin-2-carbonsäure, L-Prolin, L-Pipecolinsäure, verwandte Verbindungen, wie L-3,4Dehydroprolin, L-Thioprolin sowie die emtsprechenden durch Halogen-, Nitro-, Hydroxy-, Cyano-, niedere lineare oder
verzweigte Alkyl bzw. Alkoxyreste substituierten Derivate, beispielsweise L-4-Hydroxyprolin.
B = spezielle heterocyclische Amine oder heterocyclische Aminaldehyde: Pyrrolin, Thiazolin, Piperidin, Morpholin, Pyrazolin,
Pyrazolidin, Piperazin, Oxazolin, Oxazolidin, Imidazolin, Imidazolidin, Azetidin, vorzugsweise Pyrrolidin, Thiazolidin,
L-Prolinal, L-Thioprolinal, sowie die entsprechenden durch Halogen-, Nitro- bzw. Alkylreste substituierten Derivate.
Einige als DP IV-Inhibitoren bevorzugte erfindungsgemäße Verbindungen sind die Aminosäurederivate:

tle-pyrrolidid,

lle-thiazolidid,

lie-prolinal,

-lle-thioprolinal,

Nº-4-Nitrobenzyloxycarbonyl-Lys-pyrrolidid,

Nº-4-Nitrobenzyloxycarbonyl-Lys-thiazolidid,

Nº-4-Nitrobenzyloxycarbonyl-Lys-prolinal,

Nº-4-Nitrobenzyloxycarbonyl-Lys-thioprolinal.

Die Darstellung der erfindungsgemäßen Aminosäureamide als reversible Inhibitoren der DP IV erfolgt ausgehend von X-A-Y bzw. X-A(Z)-Y (im Falle einer trifunktioneilen Aminosäure für A) durch Umsetzung mit B, worin A und B wie zuvor definiert sind, X für eine in der Peptidschicht gebräuchliche a-Aminoschutzgruppe steht (vgl. E. Wünsch, Synthese von Peptiden in Houben Weyl Band 15/l, Methoden der organischen Chemie, Ed. E. Müller, Georg-Thieme-Verlag Stuttgart 1974), vorzugsweise ein tert. Butyloxycarbonyl-Rest, Z in Abhängigkeit von der Natur der trifunktioneilen Aminosäure eine gebräuchliche Seitenkettenschutzgruppe darstellt, bevorzugt vom tert. Butyl-Typ, d. h. für den Schutz der N°-Aminofunktion kommt der tert. Butyloxycarbonyl-Rest, für die Blockierung der o-ständigen Carboxygruppen der tert. Butylester und für Hydroxy-bzw. Thiolfunktionen der tert. Butyl-Rest zum Einsatz und Y Hydroxy, Aktivester, bevorzugt Pentafluorphenyl-bzw. N-Hydroxysuccinimidester bedeutet, nach den in der Peptidchemie Biblichen Methoden zur Knüpfung der Amidbindung nämlich N,N-Dicyclohexylcarbodiimid, N,N-Dicyclohexylcarbodiimid, N,N-Dicyclohexylcarbodiimid, N,N-Dicyclohexylcarbodiimid, N,N-Dicyclohexylcarbodiimid (vgl. E. Wünsch s. o.) oder 2-(1 H-Benzotriazol-1-yl-)-1,1,2,3-tetramethyluroniumsalze (vgl. R. Knorr et al., Abstracts 20th Europ. Peptide Symposium Tübingen 1989) bzw. Benzotriazol-1-yl-oxy-tris(dimethylamino)phosphoniumsalze (vgl. A. Fournier et al., Int. J. Peptide Protein Res., 1988, 31, 86) zu den geschützten Aminosäureamiden der allgemeinen Formet II und III

X-A-B

X--A(Z)-B

mit A, B, X, Z in der abigen Definition.

(11)

(111)

Vorzugsweise erfolgte die Knüpfung der Amidbindung zwischen A und 8 über die Mischanhydridtechnik bzw. die Aktivestermethode, wobei bevorzugt N-Hydroxysuccinimid- oder Pentafluorphenylester zum Einsatz kommen. Die erhaltenen geschützten Aminosäureamide der allgemeinen Formel il und ill können, falls erforderlich, durch Umkristallisation bzw. durch Säulenchromatographie an Kleseigel oder LH-20 gereinigt werden. Nach gleichzeitiger oder nacheinander geschalteter Abspaltung der für X und Z eingesetzten Schutzgruppen mit den in der Peptidchemie üblichen Deblockierungsverfahren (vgl. E. Wünsch s. o.) für die genannten bevorzugten Schutzgruppen tert. Butyloxycarbonyl, tert. Butylester, tert. Butyl durch Acidolyse (u. a. mittels HCl/Essigsäure; HCl/Essigester; HCl/Dioxan; Trifluoressigsäure gegebenenfalls in Gegenwart von Kationenfängern) erhält man die gewünschten Aminosäureamide der allgemeinen Formel I, die, falls erforderlich, durch Umkristallisation bzw. durch Säulenchromatographie an Sephadex G 10 oder an schwach sauren ionenaustauschern gereinigt werden können.

Die erfindungsgemäß erhaltenen Aminosäurederivate mit heterocyclischer Amidstruktur gemäß Formel i und/oder deren pharmazeutisch annehmbare Salze können als reversible inhibitoren der Dipeptidyl Peptidase IV die katalytische Aktivität des pharmazeutisch annehmbare Salze können als reversible inhibitoren der Dipeptidyl Peptidase IV die katalytische Aktivität des Enzyms in gereinigter Form als auch in normalen oder pathologisch veränderten menschlichen und tierischen Seren, in Organen, Geweben und Zellen menschlicher, tierischer, pflanzlicher und mikrobieller Herkunft sowohl in vivo als auch in vitro hemmen und als potentielle Therapeutika in Bereichen, der durch die Dipeptidyl Peptidase IV regulativ gesteuerten Stoffwechselprozesse, vorzugsweise im Rahmen der Blutdruckregulation, der Blutgerinnung, der Zellproliferation, aber auch im Processing biologisch aktiver prolinhaltiger Peptide zur Anwendung kommen.

Die Erfindung soll anhand von Ausführungsbeispielen näher erklärt werden, ohne sie einzuschränken.

Ausführungsbeispiele

Es werden folgende Abkürzungen verwendet:

Aminosauresymbole entsprechend IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature, Biochem. J., 219, 345 (1984).

SPro L-Thioprolin (L-Thiazolidin-4-carbonsaure)

AcOH Essigsaure

Boc tert. Butyloxycarbonyl

CAIBE Chlorkohlensäureisobutylester

DC Dünnschichtchromatogramm, -chromatographisch

DPIV Dipeptidyl Peptidase (V

d.Th. der Theorie

EE Essigsäureethylester

EtOH Ethanol

Fp Schmelzpunkt

h Stunde(n)

i. Vak im Vakuum

LM Lösungsmittel

MeOH Methanol

Min. Minuten

NEM N-Ethylmorpholin
OPfp Pentafluorphenylester

pNA 4-Nitroanilld RT Raumtemperatur

SC Säulenchromatographie, -chromatographisch

TEA Triethylamin
THF Tetrahydrofuran

Z(NO₂) 4-Nitrobenzyloxycarbonyl

Unter "üblicher Aufarbeitung" versteht man:

Nach beendeter Kupplungsreaktion wird das jeweilige Rohprodukt in Essigester aufgenommen und die Lösung nacheinander zweimal mit Wasser (NaCl-gesättigt), dreimal mit 5%iger KHSO₄-Lösung, zweimal mit Wasser, dreimal mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatiösung und dreimal mit Wasser gewaschen. Die organische Phase wird über Na₂SO₄ getrocknet und das Rohprodukt durch Abdampfen des Lösungsmittels im Vakuum isoliert.

Folgende Laufmittelssysteme (in Volumenanteilen) zur Dünnschichtchromatographie auf Silicagel-Fertigplatten (Silufol UV 254, CSSR) wurden verwendet:

BAE	Benzen-Aceton-Essigsäure	70 + 30 + 1,5
BAW	2-Butanol-Amelsensäure-Wasser	. '75+15+20
BEWE	1-Butanoi-Essigsäure-Wasser-Essigester	20+20+20+20
BPEW	1-Butanol-Pyridin-Essigsäure-Wesser	30+20+6+24
CM	Chloroform-Methanol	90 + 10
FPFW	Feeinaster-Pyridin-Feeinsäura-Wasser	90+15+45+23

Zur Ermittlung der inhibitorischen Aktivität der erfindungsgemäß synthetisierten DP IV-Inhibitoren wurden die Ki-Werte durch Auftragung nach Dixon (in: J.Lasch, Enzymkinetik, Fischer-VLG, Jena 1987) 1/vi gegen (i) aus dem Schnittpunkt von mindestens 3 Geraden ermittelt.

vi - gemessene initialgeschwindigkeit der DPIV-katalysierten Hydrolyse des Substrates Ala-Pro-pNA

[i] - Konzentration des als DP (V-Inhibitor untersuchten Aminosaureamides im Meßansatz

Die Messungen wurden bei pH6,3 in 0,04 M Phosphatpuffer durchgeführt. Die Ionenstärke betrug 0,125, eingestellt mit Kallumchlorid. Die Temperatur des Meßansatzes betrug 30°C. Die Bestimmung des Wertes für vi wurde bei jeder Substrat- und Inhibitorkonzentration 3fach durchgeführt.

Beispiel i

Nº-4-Nitrobenzyloxycarbonyl-L-Lysin-pyrrolidid · hydrochlorid (H-Lys[Z(NO2)]-N - HCI)

2,95g Boc-Lys[Z(NO₂)]-OH wurden in 30ml THF gelöst und bei -15°C mit 880 µl NEM und 900 µl CAIBE versetzt. Nach 6 Min. wurden 573 µl Pyrrolidin bei -15°C zugegeben. Man ließ 1 h bei -15°C und über Nacht bei RT rühren. Die Aufarbeitung erfolgte wie üblich. Das nach Trocknen i. Vak erhaltene amorphe Boo-Lys[Z(NO₂)]-N wurde in 20 ml 1,1 N HCI/AcOH gelöst und 30 Min. bei RT gelassen. Das Produkt wurde mit Ether ausgefällt und anschließend aus MeOH/Ether umkristallisiert. Die weitere

Reinigung erfolgte SC an Sephadex G 10 mit 0,1 M AcOH als Elutionsmittel.

Ausbeute: Fp: 157–160°C

[a]20: +8,67°(c=1,AcOH)

DC: einheitlich in BAW, BEWE und BPEW

Ki: (3,46 ± 0,5)+10⁻⁷M

Beispiel II		
L-Valin-pyrrolidid · hydrochlorid (H-Val-N - +HCl)		•
1,088g Boo-Val-OH wurden in 20 ml EE gelöst und bei −20°C mit 6 413µl Pyrrolidin zu und ließ 1 h bei −20°C und über Nacht bei RT rü	hren. Die Aufarbeitung erfolgte wie üblich. Das ölige	
Boo-Val-N wurde bei RT 30 Min. mit 3N HCI/EE behandelt	. Nach Einengen des LM i. Vak. kristallisierte das Produkt aus	
EIOH/EE in farblosen Nadeln aus.		
Ausbeute: 620 mg (60,3 % d. Th.)		
Fp: 178-180°C {a} ₁ ²⁰ : +33,93° (c = 1, AcOH)		
DC: einheitlich in BAW, BEWE und BPEW		
Ki: (4,75±0,7)•10 ⁻⁷ M		
Beispiel III		
L-Isoleucin-pyrrolidid · hydrochlorid (H-Ike-N - +HCl)		
1,98g Boo-lle-OPfp wurden in 15 ml THF gelöst und bei 0°C mit 450 1 h bei RT rühren. Nach Abziehen des LM L Vak. wurde der Rückstan	µl Pyrrolidin und 280 µl TEA versetzt. Man ließ 1 h bei 0℃ und d in EE aufgenommen und mit H₂O, KHSO₄-Lösung und H₂O	•
gewaschen und über Na ₂ SO ₄ getrocknet. Der EE wurde i. Vak. abge	ezogen und das ölige Boo-lie-N (30 Min. bei RT mit	
15ml 1,1 NHCVAcOH behandelt. Das Produkt wurde zunächst mit E	ther ausgefällt, abgesaugt, im Exsikkator über KOH und P2Os	
getrocknet und anschließend aus isopropanol/Ditsopropylether un Ausbeute: 760 mg (68,8 % d. 7h.)	mkristallisiert.	
Fp: 179–184°C		
[q]30: +29,31°(c=1,AcOH)		
DC: einheitlich in BAW, BEWE und BPEW Ki: (2,43 ± 0,1)+10 ⁻⁷ M	• • •	
•		
Belspiel IV	• •	er.
L-Thioprolin-pyrrolidid hydrochlorid IV.1. Boc-SPro-N		
888mg Boo-SPro-OH wurden in 10 ml THF gelöst und nach Abkült versetzt. Nach 8Min. fügte man bel –20°C 443 µl Pyrrolidin hinzu, li bel RT rühren. Danach wurde i. Vak. eingeengt, der Rückstand in E Aufnehmen des öligen Rückstandes mit n-Hexan setzte Kristalliss Ausbeute: 416 mg (38 % d. Th.)	ieß die Reaktionsmischung noch 1 h bei – 20 °C und über Nacht E aufgenommen und wie üblich aufgearbeitet. Nach	1
Fp: 108-109°C [a] ₀ ⁵ :154,2°(c=0,62, AcOH)		.,
DC: einheitlich in BAE, CM, EPEW		
,		. .
IV. 2. H-SPro-N · HCI		. :
	st, mit 300 µl Thiosnisol versetzt und 30 Min. bei RT	
		.:
stehengelassen. Anschließend engte man i. Vak. ein, versetzte den Ausbaute: 182 mg (88% d. Th.)	Macketsua unt enter autore programmente and enterà enter aute	;
Fp: 164–166°C		بد
$[\alpha]_0^{36}$: -122,7°(c=0,62; AcOH)		• •
DC: einheitlich in BAW, BEWE, BPEW Ki: (3,95 ± 0,4)+10 ⁻⁶ M		٠
M: falso talleto m		٠.
Belspiel V		~
L-Isoleucin-thiazolidid · hydrochlorid		•
F-Isolenciu-tulasolidid . uAcrocumono	•	-
V.1. Boc-lie-N		_
2,31g Boc-lle-OH wurden in 10ml THF gelöst und bei20°C unto 8 Min. fügte man bei20°C 1,26g Thiazolidin-hydrochlorid und weitere 1,27ml NEM 1-20°C 1,26g Thiazolidin-hydrochlorid und weitere 1,27ml NEM 1-Nacht bei RT rühren. Danach wurde der Ansatz i. Vak. eingeengt, aufgearbeitet. Der ölige Rückstand wurde durch Flash-Chromato Ausbeute: 952 mg (31 % d. Th.)	eltere 1,27 ml NEM hinzu, ließ das Reaktionsgemisch noch 1 h bei hinzu, ließ das Reaktionsgemisch noch 1 h bei – 20°C und über der Rückstand in EE aufgenommen und wie üblich	
[a]3 (OI): -14,1 °C (c=0,6, AcOH)		•
DC: einheitlich in BAE, CM, EPEW		

V.2. H-IIb-N T -HCI

790mg Boc-lie-thiazolidīd wurden in 8ml 1,1 N HCI/AcOH gelöst, mit 800µl Thioanisol versetzt und 30 Min. bei RT stehengelassen. Danach wurde der Ansatz I. Vak. eingeengt und das Produkt mit Ether ausgefällt.

Ausbeute: 584 mg (94 % d. Th.)

Fp: [a]g⁶: DC: Ki: 116-120°C

+18,6° (c = 0,77, AcOH) einheitlich in BPEW, BEWE, BAW {1,23 ± 0,2}•10⁻⁷ M